

ALTERAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM ORGANISMOS AQUÁTICOS POR POLUENTES DE ORIGEM AGRÍCOLA: UMA ABORDAGEM GERAL E SOBRE A SUSCETIBILIDADE DA FOSFATASE ÁCIDA

Claudio Martín Jonsson*

Embrapa Meio Ambiente, Rod. SP 340 – km 127,5, 13820-000 Jaguariúna – SP, Brasil

Hiroshi Aoyama

Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, CP 6109, 13083-970 Campinas - SP, Brasil

Recebido em 26/2/09; aceito em 29/10/09; publicado na web em 12/3/10

ALTERATION OF ENZYMATIC ACTIVITY IN AQUATIC ORGANISMS BY AGRICULTURAL POLLUTANTS: A GENERAL APPROACH AND THE SUSCEPTIBILITY OF THE ACID PHOSPHATASE. The input of agrochemicals in the aquatic compartment can results in biochemical injuries for living organisms. In this context, the knowledge of alterations of enzymatic activities due the presence of agriculture pollutants contributes for the elucidation of the mechanisms of toxicity, implementation of economic methods for monitoring purposes and establishment of maximum allowed concentrations. In the present work, the above considerations are discussed, and data concerning changes in enzymatic function by pesticides and fertilizer contaminants are reviewed. Also, we focused on the acid phosphatase due its susceptibility to several pollutants and diversity in cellular functions.

Keywords: enzyme; biomarker; pollution.

INTRODUÇÃO

Com a utilização de modernas práticas agrícolas, que resultaram na maior produção de alimentos, intensificaram-se os problemas causados por pragas. Além dos ácaros, nematoides, fungos e plantas daninhas, eram conhecidas cerca de 68.000 espécies de insetos de ação prejudicial até finais do século XX.¹ O combate a estes organismos se faz através do uso de produtos químicos denominados agrotóxicos, sendo que sua utilização abusiva tem ocasionado problemas ao Homem e ao meio ambiente, além de representar uma constante ameaça para as gerações futuras e o equilíbrio dos ecossistemas. Entre estes compostos estão incluídos os inseticidas, acaricidas, herbicidas, fungicidas, nematicidas, entre outros.

Os efeitos desses compostos para os organismos aquáticos são muito variados, seja pela quantidade de ingredientes ativos presentes no mercado, que são aproximadamente 300, no Brasil, seja pela enorme gama de espécies existentes nos corpos d'água.^{2,3} Assim sendo, a toxicidade das moléculas para uma determinada espécie pode variar até mais de 25.000 vezes e apresentar efeito letal na ordem de alguns microgramas por litro.^{4,5}

Lodo de esgoto é uma denominação genérica para o resíduo sólido gerado pelos sistemas de tratamento de águas residuais. Trata-se de um material heterogêneo, cuja composição depende do tipo de tratamento empregado para purificar o esgoto e das características das fontes geradoras (população e indústrias).⁶ O uso de lodo de esgoto como fonte alternativa de nutrientes (fertilizante) para as plantas tem sido apresentado como uma opção para seu descarte devido ao seu alto teor de matéria orgânica. A principal fonte desses elementos metálicos é o setor industrial. Deve-se levar que consideração que a preocupação com metais pesados e os possíveis efeitos prejudiciais a eles associados foi acentuada a partir do uso do lodo de esgoto em solos agrícolas.⁷ Entretanto, a presença desses metais não é exclusividade destes resíduos, uma vez que fertilizantes químicos, corretivos e defensivos podem também contê-los.⁸ Além de metais, o lodo de esgoto pode também conter contaminantes orgânicos como naftalenos e LAS (alquil benzeno linear sulfonado).⁹

Considerando-se o compartimento aquático como um dos receptáculos finais de poluentes químicos, tanto de origem agrícola como urbana, estes ingressam através de diferentes vias: escoamento superficial em áreas urbanas e rurais;^{10,11} deposição atmosférica;^{12,13} percolação através do solo previamente contaminado;^{14,15} descargas acidentais;^{16,17} lavagem de equipamentos de aplicação e manuseio inadequado de embalagens para descarte.^{18,19} Consequentemente, os efeitos adversos da interação poluente químico - biota é sentido nos diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar em um sistema aquático,^{20,21} sendo as alterações bioquímicas uma das manifestações que podem indicar o impacto dos contaminantes no compartimento ambiental.

Dentre os componentes bioquímicos, as enzimas constituem um grupo de substâncias, comumente proteínas, com função catalisadora nas vias metabólicas, podendo tal função ser alterada na presença de um xenobiótico de origem agrícola. Na Figura 1 são mostrados os mecanismos de reação de uma enzima (E), na ausência (reações na horizontal) e na presença de um inibidor (I) (reações na vertical). A enzima (E) reage com o substrato (S), para formar o complexo enzima-substrato (ES) e, posteriormente, liberar o produto (P). A formação do complexo enzima-substrato é regida pela constante de Michaelis (Km). Entretanto, a reação catalisada pela enzima pode ser alterada, por exemplo, na presença de um agente químico com ação inibitória (I). Este inibidor (I) pode se ligar à enzima livre (E), atuando como um inibidor do tipo competitivo (Figura 1A), formando um complexo enzima-inibidor (EI) inativo, cuja formação é regida pela constante de inibição (Ki). Um inibidor (I) pode, também, se ligar à enzima livre (E) ou ao complexo enzima-substrato (ES) formando, no final, o complexo enzima-substrato-inibidor (ESI) inativo, atuando, neste caso, como um inibidor do tipo não competitivo (Figura 1B). As reações de formação do complexo EI e do complexo ESI são regidas pelas constantes de inibição Ki e Ki', respectivamente.

Na presente revisão são abordados os efeitos de diversos contaminantes de origem agrícola, tais como agroquímicos e resíduos presentes nos lodos usados com fertilizantes, sobre sistemas enzimáticos de organismos aquáticos. Uma abordagem especial será dada à fosfatase ácida, devido a sua susceptibilidade a poluentes e diversificação de funções no metabolismo celular.

*e-mail: jonsson@cnpma.embrapa.br

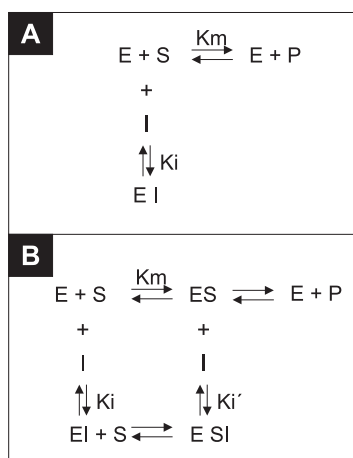


Figura 1. Mecanismos de reação de uma enzima alterados pela presença de inibidores. A) Na presença de um inibidor competitivo. B) Na presença de um inibidor não-competitivo

ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS COMO INDICADORES DE EFEITOS DE POLUENTES NO COMPARTIMENTO AQUÁTICO

O conceito básico que sustenta a utilização de bioindicadores de poluição ambiental se baseia no fato que os distúrbios por xenobióticos no meio ambiente levam, inicialmente, a uma perturbação de uma reação bioquímica em um determinado organismo.²² Se estas alterações bioquímicas forem observadas com uma certa antecedência, pode ser possível a identificação de problemas ambientais antes que o ecossistema aquático, como um todo, seja afetado.^{23,24}

Por causa destas características, os biomarcadores ao nível bioquímico são apontados como sistemas de “sinal de alerta” na avaliação da saúde ambiental.²⁵

Durante a exposição a vários tipos de contaminantes, os mesmos se concentram em células e tecidos da comunidade aquática podendo promover a alteração de sistemas enzimáticos responsáveis por processos vitais, ocorrendo: a) aumento da atividade enzimática no meio extracelular por extravasamento da proteína para este meio;^{26,27} b) aumento da atividade enzimática no meio extracelular ou intracelular por ativação enzimática, através da interação direta do agente químico com a enzima;^{28,29} c) aumento da atividade enzimática intracelular por indução na síntese da proteína;^{28,30} d) diminuição da atividade no meio extracelular ou intracelular por inibição, através da interação direta do agente químico com a proteína;^{31,32} e) diminuição da atividade no meio intracelular por comprometimento da membrana celular e extravasamento da proteína.³³

A ação de poluentes tem sido estudada nas atividades de enzimas de diversas vias metabólicas, tais como, via glicolítica;^{34,35} via da pentose-fosfato;^{36,37} ciclo de Krebs;^{38,39} síntese de aminoácidos;^{35,39} degradação de proteínas;^{40,41} cadeia respiratória;^{38,42,43} síntese de ácidos graxos;⁴⁴ metabolismo dos lipídeos;^{41,45} metabolismo do nitrogênio;^{46,47} e fotossíntese.^{48,49}

Nos últimos anos, importância especial tem sido dada aos efeitos sobre enzimas envolvidas no processo de biotransformação de xenobióticos, tanto da Fase I como da Fase II. Entre as primeiras, associadas às atividades do citocromo P450 e de monooxigenases de função mista (MFO), têm sido avaliadas a etoxiresorufina-o-deetilase (EROD) e benzopireno monooxigenases.⁵⁰⁻⁵² Com relação às enzimas de conjugação na Fase II, a glutatona-S-transferase (GST) e a UDP-glucuronosiltransferase (UDPGT) têm sido também bastante estudadas em organismos expostos em condições de laboratório e nos coletados de áreas impactadas.^{35,53,54}

As inibições das atividades da acetilcolinesterase e delta-aminolevulino-de-hidratase, bem estudadas em mamíferos, devido aos efeitos, respectivamente, de organofosforados e do chumbo, vêm sendo investigadas em peixes e outros organismos.⁵⁵⁻⁵⁷

A atividade de algumas enzimas envolvidas no metabolismo intermediário de diversas vias como ATPases e fosfatases tem sido avaliada,^{39,58-61} assim como de enzimas associadas ao estudo do estresse oxidativo como a ascorbato peroxidase,^{62,63} superóxido dismutase,^{64,65} catalase,^{62,66} peroxidase,⁶⁷ glutatona sintetase,⁶⁸ glutatona redutase e glutatona peroxidase.^{62,64,69,70}

MECANISMOS DE INIBIÇÃO E DE AUMENTO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA POR POLUENTES

A inibição competitiva (Figura 1A) ocorre quando o agente tóxico compete com o substrato na sua interação com enzima. Neste caso, a ação catalítica é reduzida devido à diminuição da proporção de moléculas de enzima que se ligam ao substrato em função do tempo.

Por outro lado, na inibição não-competitiva (Figura 1B), o inibidor e o substrato podem se ligar simultaneamente à enzima. Entretanto, esta ligação do inibidor incapacita a ação catalítica da enzima. Portanto, o inibidor não-competitivo diminui a velocidade máxima de ação enzimática porque diminui a concentração total de enzima ativa. Este último tipo de inibição está relacionado à interação Hg-SH que tem sido observada para a creatina quinase de peixes e para a fosfatase alcalina de crustáceos.^{71,72} Entretanto, uma inibição do tipo competitiva por esse metal foi também observada.⁷¹ A inibição enzimática observada na presença de metais pode ser explicada pela sua interação com grupos -SH essenciais para a catálise.⁴⁸ É importante salientar que a ligação de tais metais à enzima, em geral, ocorre de maneira irreversível e os dois tipos de inibição, acima mencionados, são exemplos de inibições reversíveis.

Encontram-se amplamente relatados na literatura exemplos de inibições competitivas, não reversíveis, como é o caso de acetilcolinesterases por inseticidas organofosforados e carbamatos.^{73,74}

Vincenzini *et al.*⁷⁵ relataram as propriedades de detergentes aniônicos de cadeia longa, como o SDS, em inibir competitivamente algumas enzimas, como a lactato desidrogenase de mamíferos e a glicose-6-fosfato desidrogenase de leveduras. De acordo com estes autores, ambos os substratos para estas enzimas, piruvato e glicose-6-fosfato, possuem uma ou duas cargas negativas concentradas em pontos específicos da molécula. Talvez pelo fato do detergente possuir uma cabeça hidrofílica carregada negativamente se comportasse como um inibidor competitivo. Este mecanismo poderia explicar a inibição *in vitro* de várias enzimas pelo detergente aniônico alquilbenzeno linear sulfonado (LAS).⁷⁶

Um outro mecanismo de inibição da atividade poderia ser devido à deficiência de um metal essencial em metaloproteínas ou complexos metálicos de proteínas, onde haveria substituição do metal deficiente pelo metal tóxico.⁶⁰ Segundo Joseph *et al.*,⁷⁷ a ligação de um metal ao fosfato orgânico contido no substrato impediria a ação da enzima na liberação do mesmo.

O acréscimo da atividade enzimática, observado pela exposição dos organismos aquáticos frente à ação de alguns poluentes, poderia ocorrer por uma indução da enzima pelo agente tóxico como parte de uma adaptação bioquímica às necessidades metabólicas aumentadas pelo estresse provocado pelo mesmo.³⁰ Uma outra suposição, para o caso de metais, é de que o organismo seria capaz de sintetizar proteínas que se ligam a elementos como um mecanismo de detoxificação.⁶⁰

A ativação enzimática poderia ainda estar associada à direta interação do poluente com a enzima, facilitando a interação com o substrato e promovendo alterações das constantes cinéticas, tais como, o aumento da velocidade máxima (Vmax) e diminuição da constante de Michaelis (Km).²⁹

Estudos *in vitro*

Estes estudos são realizados pela adição do poluente num sistema de reação contendo o substrato juntamente com a enzima, extraída de uma célula ou tecido supostamente não exposto à ação do contaminante.

Os estudos de avaliação da atividade enzimática *in vitro* representam uma ferramenta útil na triagem de vários agentes poluentes e têm sido usados em áreas de monitoramento,^{78,79} como métodos de análise semiquantitativa de poluentes orgânicos e metais pesados.⁸⁰⁻⁸⁴ Neste sentido, com base no conhecimento da interação poluente-enzima, biossensores para a detecção de metais pesados e agroquímicos foram construídos com fundamentos na inibição da fosfatase alcalina presente em algas.^{85,86} Portanto, tem se demonstrado que a medida da atividade enzimática pode ser usada como um bioindicador da presença de poluentes, consumindo menor tempo de análise e requerendo menores recursos financeiros.^{31,32} Além disto, devemos considerar que a qualidade do efeito para vários agentes químicos tende a ser semelhante à que ocorre no organismo vivo.^{33,87}

Dados de testes *in vitro* podem proporcionar informações úteis para a elucidação do mecanismo de ação tóxica sobre uma determinada espécie de organismo, além de permitirem comparações sobre a susceptibilidade de uma enzima para diferentes poluentes,^{31,56} ou ainda, sobre a susceptibilidade de diferentes enzimas para um dado poluente.^{28,88} Para isto, determinam-se parâmetros da relação concentração-efeito ou parâmetros cinéticos, tais como, concentração do composto que reduz a atividade enzimática em 50% ou concentração de inibição média (CI₅₀),^{32,87} constante de inibição (Ki) e constante de dissociação (Kd),^{72,89,90} Ou ainda, avaliam-se as alterações na velocidade máxima (Vmax) e constante de Michaelis (Km).^{29,79}

Na Tabela 1 estão apresentados alguns resultados da avaliação de parâmetros de inibição referentes a estudos *in vitro* com enzimas extraídas de diferentes organismos aquáticos.

Tabela 1. Valores de concentração de inibição média e constante de inibição de poluentes para enzimas de organismos aquáticos

Enzima	Organismo	Poluente	CI ₅₀ (mM)	Ki (mM)	REF.
Fosfatase ácida	alga	arsênio	-	0,023	91
		molibdato	-	0,6	91
Fosfatase alcalina	crustáceo peixe	mercúrio	-	0,036	72
		vanádio	-	0,2	89
		mercúrio	0,53	-	87
		cádmio	0,24	-	87
Adenilciclase	molusco	chumbo	0,025	-	92
Carboxilesterase	peixe	estanho	> 2	-	93
Acetilcolinesterase	peixe	mercúrio	0,12	-	87
		cádmio	6,2	-	87
		metil-paraaxon	123 x 10 ⁻⁶	-	94
Butirilcolinesterase	peixe	clorpirifós-oxon	2 x 10 ⁻⁹	-	95
Glutathione-S-transferase	peixe	mercúrio	0,5	-	87
		cádmio	7,1	-	87
Anilina hidroxilase	peixe	mercúrio	-	0,23	96
		níquel	-	0,43	96
		cádmio	-	0,65	96
Porfobilinogênio sintase	peixe	chumbo	-	1,3	97
		zinco	-	1,3	97
		magnésio	-	3,5	97

Estudos *in vivo*

São realizados através da medida da atividade da enzima, a qual foi extraída de um organismo-teste submetido ao agente tóxico sob um dado período de tempo. Estes testes têm sido realizados pela

exposição de organismos a concentrações conhecidas do poluente, em condições laboratoriais ou de campo, para a avaliação de risco. Portanto, os dados dose-resposta obtidos auxiliam no estabelecimento de níveis aceitáveis de concentração no compartimento aquático.^{35,39,98}

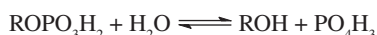
A utilização de estudos da alteração da atividade enzimática pela exposição *in vivo* na avaliação de áreas impactadas e seu monitoramento têm sido extensamente abordadas pela literatura, tanto para poluentes orgânicos como para metais.^{50,87,99-101}

A título de exemplificação, na Tabela 2 é mostrada a susceptibilidade de várias enzimas após a exposição de algas a poluentes de origem agrícola.

Fosfatases ácidas

As fosfatases ácidas ou ortofosfato mono éster fosfo-hidrolases (E.C.3.1.3.2.) são enzimas que se caracterizam pela hidrólise de uma grande variedade de ésteres de ortofosfato e reações de transfosforilação,¹¹⁴ como esquematizado a seguir:

Hidrólise:



Transfosforilação:



* aceptor com função álcool

A fosfatase ácida foi inicialmente observada em eritrócitos,¹¹⁵ sendo capaz de hidrolisar a ligação éster do fosfato do monofenilfosfato e monoalquilfosfato em pH ótimo entre 5,0 e 6,0, ao contrário da fosfatase alcalina de glóbulos brancos que catalisa essa reação com um pH ótimo de 8,8 a 9,0. Inicialmente a diferença entre as fosfatases ácidas e alcalinas era baseada somente no pH ótimo para a atividade enzimática. Neuman observou que o mecanismo de reação era diferente para as duas enzimas,¹¹⁶ onde a fosfatase ácida requeria para a sua atividade um oxigênio entre o radical e o fosfato. Chaimovich e Nome relataram a atividade das fosfatases ácidas com ausência de cátions mono e bivalentes no meio de reação, enquanto as fosfatases alcalinas requerem metais, principalmente Mg²⁺, para sua atividade.¹¹⁷

Função das fosfatases ácidas e os efeitos de poluentes

Os lisossomos e as membranas celulares são os primeiros alvos de efeitos de poluentes, uma vez que os lisossomos estão associados com a desintegração de material estranho, e a membrana celular é a primeira barreira encontrada pelo xenobiótico. Portanto, muitos agentes tóxicos e outros fatores estressantes induzem alterações nas membranas lisossomais levando a sua desestabilização.¹¹⁸ Esta causa o extravasamento de enzimas hidrolíticas do compartimento lisossomal para o citosol. Portanto, a associação entre hidrolases lisossomais e a membrana lisossomal resulta no fato de que a maior parte da atividade enzimática está normalmente em estado de latência e que se, por alguma razão, a membrana lisossomal se desestabiliza, as enzimas extravasam para o citoplasma com consequente autólise celular.^{119,120}

A fosfatase ácida é considerada uma hidrolase lisossomal biomarcadora sendo que, em situações de estresse celular, ocorre extravasamento da enzima para fluidos intra e extracelulares ocasionando a alteração de seus níveis, que pode ser tratada como indicadora de tal estresse.²⁷

A transdução de sinal na célula refere-se a qualquer processo em que esta converte um sinal em outro sinal como, por exemplo, o que comanda a síntese de uma determinada proteína. A maioria desses

Tabela 2. Alteração da atividade de enzimas de algas pela ação de poluentes de origem agrícola

Enzima	Poluente	Espécie	Efeito	Ref.
Ascorbato peroxidase	Oxifluorfen	<i>S. obliquus</i>	aumento	62
	Diuron	<i>S. obliquus</i>	inalterado	62
	Cu ²⁺	<i>G. tenuistipitata</i>	aumento	102
ATPase	Zn ²⁺	<i>S. quadricauda</i>	diminuição	60
	Al ²⁺ , Zn ²⁺	<i>S. capricornutum</i>	diminuição	103
	Cu ²⁺	<i>C. vulgaris</i>	diminuição	46
eta-D-galactosidase	Cu ²⁺ , Hg ²⁺ , Cd ²⁺	<i>D. tertiolecta</i>	diminuição	104
Ca ²⁺ ATPase	Al ³⁺	<i>C. vulgaris</i>	diminuição	47
Catalase	Oxifluorfen	<i>S. obliquus</i>	aumento	62
	Diuron	<i>S. obliquus</i>	inalterado	62
	Cd ²⁺ , Ni ²⁺	<i>S. armatus</i>	aumento	67
Elongase de síntese de ac. graxos	Thenychlor	<i>Scenedesmus sp</i>	diminuição	44
Esterase	Cu ²⁺	<i>S. capricornutum</i>	diminuição	105
	LAS	<i>N. gaditana</i>	diminuição	106
Ferridoxina nitrato redutase	Cd ²⁺	<i>C. reinhardtii</i>	inalterado	107
Fitoquelatina sintase	Zn ²⁺ , Cd ²⁺	<i>D. tertiolecta</i>	aumento	68
Fosfatase alcalina	Dimetoato	<i>C. vulgaris</i>	aumento	108
	Hg ²⁺ , Pb ²⁺	<i>S. bijuga</i>	diminuição	39
Fosfatase ácida	Hexaclorobenzeno	<i>S. capricornutum</i>	diminuição	109
	Hg ²⁺ , Pb ²⁺	<i>S. bijuga</i>	diminuição	39
Gama-glutamyl-cisteina sintetase	Zn ²⁺ , Cd ²⁺	<i>D. tertiolecta</i>	aumento	68
Glicose-6-fosfato-desidrogenase	Hexaclorobenzeno	<i>S. capricornutum</i>	diminuição	109
	Al ³⁺	<i>S. capricornutum</i>	diminuição	103
Glutamato desidrogenase	Hg ²⁺ , Pb ²⁺	<i>S. bijuga</i>	aumento	39
Glutamina sintetase	Cd ²⁺	<i>C. reinhardtii</i>	diminuição	107
Glutathione peroxidase	Ni ²⁺	<i>S. acutus</i>	aumento	64
Glutathione redutase	Oxifluorfen	<i>S. obliquus</i>	aumento	62
	Diuron	<i>S. obliquus</i>	inalterado	62
	Cd ²⁺	<i>N. oculata</i>	diminuição	110
Glutathione sintetase	Zn ²⁺ , Cd ²⁺	<i>D. tertiolecta</i>	aumento	68
Glutathione-S-transferase	Oxifluorfen	<i>S. obliquus</i>	aumento	62
	Diuron	<i>S. obliquus</i>	inalterado	62
Malato desidrogenase	Hg ²⁺ , Pb ²⁺	<i>S. bijuga</i>	diminuição	39
Mg ⁺⁺ ATPase	A ³⁺	<i>C. vulgaris</i>	diminuição	47
NAD ⁺ isocitrato desidrogenase	Cd ²⁺	<i>C. reinhardtii</i>	aumento	111
NADH glutamato sintetase	Cd ²⁺	<i>C. reinhardtii</i>	inalterado	107
NADP ⁺ isocitrato desidrogenase	Cd ²⁺	<i>C. reinhardtii</i>	aumento	111
NADPH óxido redutase	Hg ²⁺ , Cd ²⁺ , Zn ²⁺	<i>E. gracilis</i>	diminuição	48
Nitrato redutase	Al ³⁺	<i>C. vulgaris</i>	diminuição	47
	Zn ²⁺	<i>S. capricornutum</i>	diminuição	103
O-acetil-L-serina(tiol)liase	Cd ²⁺	<i>C. reinhardtii</i>	aumento	111
	Cd ²⁺	<i>C. reinhardtii</i>	inalterado	107
Peroxidase	Cd ²⁺ , Ni ²⁺ , Mn ²⁺	<i>S. armatus</i>	aumento	67
Protoclorofilida redutase	Hg ²⁺ , Cd ²⁺	<i>E. gracilis</i>	diminuição	48
Protoporfirinogênio IX oxidase	Tiosemicarbazidas	<i>S. acutus</i>	diminuição	112
Serina acetil transferase	Cd ²⁺	<i>C. reinhardtii</i>	aumento	111
Superóxido dismutase	Cu ²⁺	<i>G. tenuistipitata</i>	aumento	102
	Ni ²⁺	<i>S. acutus</i>	diminuição	64
	Antraceno	<i>S. subspicatus</i>	aumento	113
	Cd ²⁺	<i>S. subspicatus</i>	aumento	113
Transaminase glutâmico oxaloacética	Pb ²⁺	<i>S. bijuga</i>	diminuição	39
Transaminase glutâmico pirúvica	Hg ²⁺ , Pb ²⁺	<i>S. bijuga</i>	diminuição	39
Urease	Cu ²⁺	<i>C. vulgaris</i>	diminuição	46

eventos envolve uma sequência ordenada de reações executada por enzimas, que resulta numa via de transdução de sinal. Assim sendo, as fosfatases ácidas podem atuar na desfosforilação de receptores de moléculas sinalizadoras, como a insulina, na regulação do processo de transdução de sinal.¹²¹ Neste contexto, as fosfatases ácidas participam em processos de sinalização celular como, por exemplo, os que

envolvem o ácido ascórbico na resposta a condições fotooxidativas e ataques de patógenos em plantas.¹²²

Na Tabela 3 estão apresentados alguns dados da literatura referentes à alteração da atividade desta enzima em diversos organismos aquáticos. Entre estes, os peixes têm sido alvo de estudo em muitos trabalhos que tratam de efeitos de poluentes na fosfatase ácida (Tabela 4),

Tabela 3. Efeito de poluentes de origem agrícola na fosfatase ácida de diversos organismos aquáticos

Organismo	Poluente	Sistema de exposição	Origem	Efeito na atividade	Ref.
FUNGO					
<i>A. proliferiodes</i>	clortalonil	<i>in vivo</i>	organismo todo	aumento	123
<i>D. sterilis</i>	clortalonil	<i>in vivo</i>	organismo todo	diminuição	123
PROTOZOÁRIO					
<i>T. pyriformis</i>	cobre	<i>in vivo</i>	organismo todo	aumento/diminuição	124
PLANTA					
<i>S. oligorrhiza</i>	cobre	<i>in vitro</i>	organismo todo	inalterado	125
CRUSTACEO					
<i>D. magna</i>	cobre	<i>in vivo</i>	organismo todo	diminuição	126
Camarão	aldrin, lindano	<i>in vitro</i>	vários tecidos	diminuição	127
Artemia	metilparation	<i>in vivo</i>	hepatopâncreas	aumento	127
Caranguejo	diclorvos	<i>in vivo</i>	vários tecidos	aumento	128
	endosulfan	<i>in vivo</i>	vários tecidos	aumento/diminuição	129
	cipermetrina, endosulfan	<i>in vitro</i>	organismo todo	diminuição	31
	metomyl, clorpirifós	<i>in vitro</i>	organismo todo	diminuição	31
	monocrotofós	<i>in vitro</i>	organismo todo	diminuição	130
MOLUSCO					
Bivalve	metais em estuário	<i>in vivo</i>	digestivo e rim	diminuição	131
	zinco, chumbo	<i>in vivo</i>	hemócitos	diminuição	132
	cobre	<i>in vivo</i>	brânquias/glândula digestiva	aumento	133
Gastrópodo					
	aldicarb, aldoxycarb	<i>in vivo</i>	organismo todo	diminuição	134
	metomyl, oxamyl	<i>in vivo</i>	hemolinfa	diminuição	134
	cobre	<i>in vivo</i>		aumento	27
INSETO					
Hemiptera	cobre, chumbo	<i>in vivo</i>	organismo todo	aumento	135

Tabela 4. Efeito de poluentes de origem agrícola sobre a fosfatase ácida de peixes

Poluente	Sistema de exposição	Tecido	Espécie	Efeito na atividade	Ref.
Mistura de pesticidas, metais, PCBs*, PAHs**	<i>in vitro</i>	hepatócitos isolados	<i>O. mykiss</i>	aumento	66
Mistura de pesticidas, PCBs, PAHs	<i>in vitro</i>	hepatócitos isolados	<i>O. mykiss</i>	diminuição	136
Deltametrina	<i>in vivo</i>	fígado	<i>O. mossambicus</i>	diminuição	137
Aldicarb	<i>in vivo</i>	intestino	<i>P. conchoni</i>	inalterado	33
	<i>in vitro</i>	intestino	<i>P. conchoni</i>	inalterado	
Endosulfan	<i>in vivo</i>	fígado, músculo	<i>C. gachua</i>	diminuição	138
	<i>in vivo</i>	ovário	<i>P. conchoni</i>	aumento	33
	<i>in vitro</i>	ovário	<i>P. conchoni</i>	inalterado	33
Quinalfós	<i>in vivo</i>	cérebro	<i>L. rohita</i>	aumento	139
Cipermetrina	<i>in vivo</i>	fígado	<i>H. fossilis</i>	diminuição	59
Dimetoato	<i>in vivo</i>	fígado	<i>L. thermalis</i>	aumenta	140
		músculo	<i>L. thermalis</i>	aumenta	140
Malation	<i>in vivo</i>	fígado	<i>B. rerio</i>	diminuição	141
Monocrotofós	<i>in vivo</i>	plasma	<i>C. punctatus</i>	aumento	142
p-t-butilfenol	<i>in vivo</i>	músculo	<i>C. carpio</i>	aumento	143
Toxafeno	<i>in vivo</i>	hepatócitos isolados	<i>P. ferrugineus</i>	aumento	144
Disulfoton + endosulfan	<i>in vivo</i>	fígado	<i>O. mykiss</i>	diminuição	38
LAS	<i>in vivo</i>	brânquias, fígado	<i>C. carpi</i>	diminuição	145
	<i>in vivo</i>	intestino, rim	<i>M. vittatus</i>	diminuição	146
Cobre	<i>in vivo</i>	intestino	<i>P. conchoni</i>	aumento	28
	<i>in vitro</i>	intestino	<i>P. conchoni</i>	inalterado	28
	<i>in vitro</i>	fígado	<i>P. conchoni</i>	inalterado	28
	<i>in vivo</i>	fígado	<i>P. conchoni</i>	diminuição	28
Cádmio	<i>in vivo</i>	ovário	<i>B. conchoni</i>	aumento	30
	<i>in vitro</i>	ovário	<i>B. conchoni</i>	inalterado	30
	<i>in vivo</i>	soro	<i>L. macrochirus</i>	aumento	147
Mercurio	<i>in vivo</i>	fígado, brânquias	<i>N. notopterus</i>	diminuição	148

*Bifenilas policloradas. **Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

talvez pelo fato de serem os organismos mais representativos e de maior importância econômica nos ecossistemas aquáticos.

As Tabelas 3 e 4 demonstram que os efeitos são de natureza diversa podendo ocorrer aumento, diminuição ou mesmo, não alteração da atividade fosfatásica. Estas respostas são particulares para cada agente químico em relação ao sistema de exposição (*in vitro* ou *in vivo*), tecido e organismo. Isto estaria relacionado a que cada espécie é caracterizada por um padrão específico de isoenzimas, tal como a variabilidade em isoformas de fosfatase ácida que ocorre entre oito espécies de fungos aquáticos do gênero *Achlya*.¹⁴⁹

Pelo motivo de serem as algas componentes da base da cadeia alimentar nos ecossistemas aquáticos, aliado ao envolvimento das fosfatases no metabolismo de um elemento, o fósforo, de extrema importância para a viabilidade desses organismos, serão abordados alguns aspectos sobre as fosfatases ácidas de algas e sua resposta à ação de agentes tóxicos.

Fosfatases ácidas de algas e sua susceptibilidade a poluentes

Várias funções têm sido atribuídas a estas enzimas em algas, tais como a participação em processos autofágicos digestivos e hidrólise de material fosfolipídico;¹⁵⁰ rompimento de plasmalema e absorção do flagelo durante a fertilização; reciclagem de fosfato inorgânico para sua reassimilação;¹⁵¹⁻¹⁵³ diferenciação dos esporos;¹⁵⁴ transporte de substâncias através de membranas e disponibilidade de fosfato inorgânico a partir do meio extracelular.^{155,156} Esta última função também é desempenhada pela fosfatase alcalina, cuja atividade é aumentada pela exposição das algas em um meio de cultura deficiente em fosfato inorgânico.¹⁵⁷⁻¹⁵⁹

Os trabalhos sobre o aumento de síntese de fosfatases ácidas em algas pela ausência de fosfato inorgânico no meio de cultura, assim como o estudo das propriedades destas fosfatases induzidas e das constitutivas, datam da década de 1960 em pesquisas realizadas com *Euglena gracilis* e *Chlorella pyrenoidosa*.^{91,160}

A extração da fosfatase ácida de algas do gênero *Selenastrum* foi relatada por Kong e Chen e por Kong *et al.* utilizando tampão Tris-borato 0,1-0,3 M pH 7,5 e centrifugação a 10.000 x g.^{103,109} Entretanto, os autores não descreveram o método de ruptura celular utilizado. Para este procedimento, técnicas que utilizam ultrassom foram descritas na extração de fosfatases das algas clorofíceas *Chlamydomonas* e *Chlorella vulgaris*.^{47,108,161,162} Patni e Aaronson usaram pérolas de vidro e centrifugação para extrair a enzima de *Ochromonas danica*.¹⁶³ Esta enzima também pode ser extraída em uma preparação de pó cetônico quando um precipitado algáceo é tratado com acetona à temperatura de -20 a -30 °C.^{91,160,164}

A alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* tem sido adotada em vários trabalhos como organismo modelo para o estudo de fosfatases. Esta alga produz duas formas principais de fosfatases ácidas constitutivas que diferem quanto a sua sensibilidade à inativação térmica,¹⁶¹ as quais estão invariavelmente presentes em células cultivadas na ausência ou presença de fosfato inorgânico com atividade máxima em pH de aproximadamente 5,0.^{159,162} Quando o extrato dessa mesma espécie, crescida na presença de Pi, é submetido à eletroforese de isoeletrofocalização, ocorre o aparecimento de três bandas referentes a fosfatases ácidas com diferentes valores de pontos isoeletrônicos.¹⁶⁵

As fosfatases ácidas de algas também têm sido caracterizadas quanto a sua especificidade para diferentes substratos, efeito de metais na atividade,^{163,166} valor de Km para um dado substrato e energia de ativação.^{91,163,164} Entretanto, existe uma carência de informações na literatura quanto às propriedades destas enzimas e sua utilização como bioindicadoras de efeitos de poluentes.

Em algas, as fosfatases ácidas estão localizadas em vários compartimentos celulares. Segundo Cooper *et al.*,¹⁵⁰ a enzima está presente

em vacúolos, dispersa no citoplasma e em pontos de degradação focal. A enzima também foi encontrada no complexo de Golgi,^{150,154} mitocôndria,¹⁵⁵ membrana de tilacoides,¹⁵⁵ sistema de endomembrana,¹⁵² membrana externa e corpos-PAS.^{155,156,167} Segundo Tornqvist,¹⁵⁵ a localização da atividade fosfatásica ácida é alterada do citoplasma para a parede celular quando algas clorofíceas são expostas a íons metálicos, como Al³⁺.

Patni e Aaronson,¹⁶³ estudando os efeitos *in vitro* em sistema pré-incubado, observaram que a fosfatase ácida intracelular extraída de *Ochromonas danica* é mais susceptível à inibição pelo Hg²⁺, enquanto que a extracelular é mais sensível à inibição pelo Cu²⁺. Em um sistema de exposição semelhante, a alteração da atividade da enzima extraída de *Pseudokirchneriella subcapitata* foi avaliada frente a ação de 30 poluentes de origem agrícola, constatando-se que somente o íon Cu²⁺ possuía efeito ativador.⁶¹ Este elemento também aumentou a atividade da enzima da macroalga marinha *Ulva fasciata* quando exposta às concentrações de 50 e 100 µM.¹⁶⁸ Segundo Joseph *et al.*,⁷⁷ um possível mecanismo pelo qual ocorreria o aumento da atividade da enzima em *Chlamydomonas reinhardtii* exposta ao Al³⁺ seria explicado pela ligação deste ao fosfato orgânico. Nesta situação, a utilização de fosfato estaria comprometida e a célula induziria a síntese da fosfatase como uma resposta compensatória.

Como foi anteriormente descrito, apesar de alguns estudos relatarem um efeito ativador ou indutor da síntese da enzima na presença do poluente, resultando numa maior atividade, a maioria dos trabalhos aborda os efeitos inibitórios. Kong *et al.*¹⁰⁹ observaram uma correlação positiva entre o número de átomos de halogênio em halogenobenzenos e o decréscimo da atividade específica da fosfatase ácida em culturas de *Selenastrum capricornutum* contendo estes compostos.

Metais pesados considerados altamente tóxicos para algas, tais como Hg²⁺ e Cu²⁺, demonstraram a capacidade de diminuir a atividade da fosfatase ácida destes organismos quando expostos a pequenas concentrações. Assim, por exemplo, aproximadamente 90% desse parâmetro foi reduzido por 10 µM de Hg²⁺ em *Scenedesmus bijuga*.³⁹ O Cu²⁺, por sua vez, diminui a atividade específica em *C. vulgaris* em aproximadamente 50% quando a alga foi exposta a 31 µM.¹⁶⁹ Porém, isto foi observado em culturas crescidas em pH 4,0, sendo que somente cerca de 20% da atividade foi afetada em pH 6,8.

Elementos metálicos com maiores concentrações permissíveis na água e maiores valores de concentração efetiva média (CE₅₀ ou concentração que inibe o crescimento algáceo em 50%) para algas também demonstraram alterar a atividade quando testados na concentração da ordem de 100 µM ou bem inferior a esta. Assim, o efeito na atividade específica pelo Zn²⁺ em estudos com *Scenedesmus obliquus* e *Selenastrum capricornutum* demonstraram que a diminuição de aproximadamente 50% desse parâmetro ocorria nas concentrações de 120 µM (10 dias de exposição) e 4 µM (4 dias de exposição), respectivamente.^{60,103} Porém, observou-se um aumento da atividade específica superior a 200% em *Scenedesmus quadricauda* exposta a 70 µM desse metal.⁶⁰

Uma redução significativa, de aproximadamente 20%, da atividade da enzima foi constatada em culturas de *Chlorella vulgaris* expostas a 150 µM de Al³⁺ durante 15 dias.⁴⁷ A mesma porcentagem de redução foi obtida com uma concentração 1000 vezes menor desse metal em *S. capricornutum* exposta por 4 dias.¹⁰³ O Ni²⁺, por sua vez, diminuiu a atividade específica em cerca de 20% em *C. vulgaris* exposta a 34 µM,¹⁶⁹ enquanto que o Pb²⁺ reduziu a atividade na ordem de 60% em *S. bijuga* exposta a 10 µM.³⁹

O efeito inibidor interativo entre Al³⁺ e F⁻ sobre a fosfatase de *C. vulgaris*, cultivada na presença de ambos metais, demonstrou ser sinérgico para a forma ácida, enquanto que foi aditivo para a forma alcalina.⁴⁷

A alteração de fatores físico-químicos no meio de cultura, como a aplicação de radiação UV-B e diminuição do pH,^{46,169} aumentou o efeito inibitório do Cu²⁺ sobre a atividade específica da fosfatase ácida.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No Brasil, a legislação que regula a emissão e a concentração máxima permissível de agroquímicos, assim como de outros compostos tóxicos, em corpos de águas superficiais para a preservação das comunidades aquáticas está fundamentada na Resolução Nº 357 de 17/03/05 do CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente.¹⁷⁰ Entretanto, esta resolução especifica concentrações máximas permisíveis para diferentes classes de água somente para aproximadamente menos de 30 compostos de uso agrícola, sendo que alguns destes produtos já foram retirados do mercado e, aparentemente, estão em desuso. Os parâmetros de níveis aceitáveis nessa legislação, tanto para agrotóxicos como para outros poluentes, têm sido propostos com base em legislações internacionais. Além disso, devemos considerar que a maioria desses parâmetros têm sido proposta com base em efeitos não tão sutis, como são as alterações em componentes bioquímicos. Deste modo, a avaliação da atividade enzimática dos diferentes níveis tróficos representa um instrumento importante na avaliação de risco em nível laboratorial ou em campo.

O uso de parâmetros biológicos para medir a qualidade da água de um sistema supostamente impactado como, por exemplo, parâmetros de natureza bioquímica, baseia-se nas respostas dos organismos em relação ao meio onde vivem. Neste sentido, sendo o Brasil um país eminentemente agrícola constata-se o apreciável risco de áreas sujeitas à degradação, incluindo os compartimentos aquáticos. Assim sendo, a utilização de avaliações de atividade enzimática em organismos supostamente expostos à ação de xenobióticos constitui uma ferramenta relevante para fins de monitoramento.

REFERÊNCIAS

- Murty, A. S. Em *Toxicity of Pesticides to Fish*; Murty, A. S., ed.; CRC Press: Boca Raton, 1986, vol. 1.
- Bedor, C. N. G.; Ramos, L. O.; Rego, M. A. V.; Pavão, A. C.; Augusto, L. G. S.; *Rev. Baiana Saúde Públ.* **2007**, *31*, 68.
- Garcia, E. G.; Bussacos, M. A.; Fischer, F. M.; *Rev. Saúde Públ.* **2005**, *39*, 832.
- Verma, S. R.; Bansal, S. K.; Gupta, A. K.; Pal, N.; Tyagi, A. K.; Bhatnagar, M. C.; Kumar, V.; Dalela, R. C.; *Water Res.* **1982**, *16*, 525.
- Jonsson, C. M.; Toledo, C. M. F.; *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **1993**, *24*, 151.
- Rocha, M. T.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 1998.
- Singh, R. P.; Agrawal, M.; *Waste Manag.* **2008**, *28*, 347.
- Mattiazzo, M. E.; Berton, R. S.; Cruz, M. C. P. Em *Micronutrientes e Elementos Tóxicos na Agricultura*; Ferreira, M. E.; Cruz, M. C. P.; van Raij, B.; Abreu, C. A., eds.; CNPq/FAPESP/POTAFOS: Jaboticabal, 2001.
- Erhardt, W.; Prüß, A.; *Organic Contaminants in Sewage Sludge for Agriculture Use*, European Commission, Joint Research Center, UMEG Center for Environmental Measurements: Karlsruhe, 2001.
- Nimmo, D. R. Em *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Application*; Rand, G. M.; Petrocelli, S. R., eds.; Hemisphere Publishing Corporation: Washington, 1985.
- Jergentz, S.; Mugni, H.; Bonetto, C.; Schulz, R.; *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2004**, *46*, 345.
- Brun, G. L.; Mac Donald, R. M.; Verge, J.; Aubé, J.; *Chemosphere* **2008**, *71*, 314.
- Leland, H. V.; Kuwabara, J. S. Em *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Application*; Rand, G. M.; Petrocelli, S. R., eds.; Hemisphere Publishing Corporation: Washington, 1985.
- Singh, S. P.; Tack, F. M. G.; Gabriels, D.; Verloo, M. G.; *Water, Air, Soil Pollut.* **2000**, *118*, 73.
- Pang, X. P.; Letey, J.; *Soil Sci.* **1999**, *164*, 922.
- Ortiz, J. B.; Gonzalez De Canales, M. L.; Sarasquete, C.; *Scientia Mar.* **2003**, *67*, 53.
- Taylor, G. E. Jr.; Schaller, K. B.; Geddes, J. D.; Gustin, M. S.; *Environ. Toxicol. Chem.* **1996**, *15*, 1694.
- Hurtig, A. K.; San Sebastian, M.; Soto, A.; Shingre, A.; Zambrano, D.; Guerrero, W.; *Arch. Environ. Health* **2003**, *58*, 223.
- Felsot, A. S.; Racke, K. D.; Hamilton, D. J.; *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **2003**, *177*, 123.
- Jonsson, C. M.; Maia, A. H. N.; *Pesticidas (UFPR)* **2007**, *17*, 1.
- Jonsson, C. M.; Paraiba, L. C.; Mendoza, M. T.; Sabater, C.; Carrasco, J. M.; *Chemosphere* **2001**, *43*, 321.
- Valavanidis, A.; Vlahogianni, T.; Dassenakis, M.; Scoullou, M.; *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2006**, *64*, 178.
- Henderson, R. F.; *Toxicol. Lett.* **1995**, *82*, 379.
- Jimenez, B. D.; Stegeman, J. J.; *Am. Fish. Soc. Symp.* **1990**, *8*, 67.
- Payne, J. F.; Fancey, L.; Rahimtula, A.; Porter, E.; *Comp. Biochem. Physiol. C.* **1987**, *86*, 233.
- Netrawali, M. S.; Gandhi, S. R.; *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1990**, *44*, 819.
- Suresh, P. G.; Reju, M. K.; Mohandas, A.; *Sci. Total Environ.* **1993**, *Suppl. 2*, 1265.
- Gill, T. S.; Tewari, H.; Pande, J.; *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **1992**, *23*, 294.
- Bounias, M.; Kruk, I.; Nectoux, M.; Popeskovic, D.; *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **1996**, *35*, 67.
- Gill, T. S.; Tewari, H.; Pande, J.; *Comp. Biochem. Physiol. C* **1991**, *100*, 501.
- Elsebae, A. A.; *Alex. Sci. Exch.* **1996**, *17*, 417.
- El Demerdash, F. M.; Yousef, M. I.; Elagamy, E. I.; *J. Environ. Sci. Health B* **2001**, *36*, 29.
- Gill, T. S.; Pande, J.; Tewari, H.; *Pest. Biochem. Physiol.* **1990**, *38*, 231.
- Tripathi, G.; Verma, P.; *Pest. Biochem. Physiol.* **2006**, *86*, 167.
- Jonsson, C. M.; Ferracini, V. L.; Paraiba, L. C.; Rangel, M.; Aguiar, S. R.; *Scientia Agri.* **2002**, *59*, 441.
- Samuel, M.; Sastry, K. V.; *Pest. Biochem. Physiol.* **1989**, *34*, 1.
- Surendranath, P.; Ghouselazam, S.; Rao, K. V. R.; *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1991**, *46*, 738.
- Arnold, H.; Pluta, H. J.; Braunbeck, T.; *Aquat. Toxicol.* **1995**, *33*, 17.
- Fathi, A. A.; *Folia Microbiol.* **2002**, *47*, 667.
- Simon, L. M.; Laszlo, K.; Kotorman, M.; Vertesi, A.; Bagi, K.; Nemcsok, J.; *J. Environ. Sci. Health B Pest. Food Contam. Agr. Wastes* **1999**, *34*, 819.
- Kotorman, M.; Laszlo, K.; Nemcsok, J.; Simon, L. M.; *J. Environ. Sci. Health A Toxic Hazar. Subst. Environ. Engin.* **2000**, *35*, 1517.
- Tugiyono; Gagnon, M. M.; *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **2002**, *132*, 425.
- Singh, A.; Agarwal, R. A.; *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1993**, *51*, 445.
- Takahashi, H.; Ohki, A.; Kato, S.; Tanaka, A.; Sato, Y.; Matthes, B.; Boeger, P.; Wakabayashi, K.; *Pest. Biochem. Physiol.* **2001**, *71*, 140.
- Rao, K. V. R.; Surendranath, P.; *Pest. Biochem. Physiol.* **1991**, *39*, 205.
- Rai, P. K.; Rai, L. C.; *J. Gen. Appl. Microbiol.* **1997**, *43*, 281.
- Rai, L. C.; Husaini, Y.; Mallick, N.; *Aquat. Toxicol.* **1998**, *42*, 67.
- van Assche, F.; Clijsters, H.; *Plant Cell Environ.* **1990**, *13*, 195.
- Trebst, A.; Depka, B.; Hollander-Czytko, H.; *FEBS Lett.* **2002**, *516*, 156.
- Fenet, H.; Casellas, C.; Bontoux, J.; *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **1998**, *40*, 137.
- Ruus, A.; Sandvik, M.; Ugland, K. I.; Skaare, J. U.; *Aquat. Toxicol.* **2002**, *61*, 73.
- Ramljak, S.; Hackenberger, B. K.; Smital, T.; Britvic, S.; *J. Environ. Sci. Health B, Pest. Food Contam. Agric. Wastes* **2000**, *35*, 751.
- Taysse, L.; Chambras, C.; Marionnet, D.; Bosgiraud, C.; Deschiaux, P.; *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1998**, *60*, 300.

54. Tarja, N.; Kirsti, E.; Marja L.; Kari E.; *Environ. Toxicol.* **2003**, *18*, 219.
55. Burden, V. M.; Sandheinrich, M. B.; Caldwell, C. A.; *Environ. Pollut.* **1998**, *101*, 285.
56. Jin-Clark, Y.; Lydy, M. J.; Zhu, K. Y.; *Environ. Toxicol. Chem.* **2002**, *21*, 598.
57. Denton, D. L.; Wheelock, C. E.; Murray, S. A.; Hammock, B. D.; Hinton, D. E.; *Environ. Toxicol. Chem.* **2003**, *22*, 336.
58. Glover, C. N.; Petri, D.; Tollefsen, K. E.; Jørum, N.; Handy, R. D.; Berntssen, M. H.; *Aquat. Toxicol.* **2007**, *84*, 346.
59. Saha, S.; Kaviraj, A.; *Chemosphere* 2009, *74*, 1254.
60. Omar, H. H.; *Int. Biodeter. Biodegrad.* **2002**, *50*, 95.
61. Jonsson, C. M.; Aoyama, H.; *Chemosphere* **2007**, *69*, 849.
62. Geoffroy, L.; Teisseire, H.; Couderchet, M.; Vernet, G.; *Pest. Biochem. Physiol.* **2002**, *72*, 178.
63. Mallick, N.; *J. Plant Physiol.* **2004**, *161*, 591.
64. Randhawa, V. K.; Zhou, F.; Jin, X.; Nalewajko, C.; Kushner, D. J.; *Can. J. Microbiol.* **2001**, *47*, 987.
65. Zikic, R. V.; Stajn, A. S.; Pavlovic, S. Z.; Ognjanovic, B. I.; Saicic, Z. S.; *Physiol. Res.* **2001**, *50*, 105.
66. Strmac, M.; Braunbeck, T.; *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2002**, *53*, 293.
67. El Enany, A. E.; Issa, A. A.; *Folia Microbiol.* **2001**, *46*, 227.
68. Tsuji, N.; Hirayanagi, N.; Iwabe, O.; Namba, T.; Tagawa, M.; Miyamoto, S.; Miyasaka, H.; Takagi, M.; Hirata, K.; Miyamoto, K.; *Phytochemistry* **2003**, *62*, 453.
69. Pena-Llopis, S.; Pena, J. B.; Sancho, E.; Fernandez-Vega, C.; Ferrando, M. D.; *Chemosphere* **2001**, *45*, 671.
70. Elia, A. C.; Galarini, R.; Taticchi, M. I.; Dorr, A. J.; Mantilacc, L.; *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2003**, *55*, 162.
71. Araujo, G. M.; Silva, C. B.; Hasson-Voloch, A.; *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1996**, *28*, 491.
72. Chen, Q. X.; Zheng, W. Z.; Lin, J. Y.; Shi, Y.; Xie, W. Z.; Zhou, H. M.; *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2000**, *32*, 879.
73. Komersová, A.; Masopustová, M.; Komers, K.; St pánková, S.; Cegan, A.; *Z. Naturforsch. C* **2007**, *62*, 305.
74. Venkateswara, R. J.; Shilpanjali, D.; Kavitha, P.; Madhavendra, S. S.; *Arch. Toxicol.* **2003**, *77*, 227.
75. Vincenzini, M. T.; Favilli, F.; Terves, C.; Vanni, P.; *Life Sci.* **1982**, *31*, 463.
76. Gupta, B. N.; Mathur, A. K.; Agarwal, C.; Singh, A.; *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1989**, *42*, 375.
77. Joseph, E. M.; Morel, F. M. M.; Price, N. M.; *Can. J. Fish. Aqu. Sci.* **1995**, *52*, 353.
78. Repetto, G.; Peso, A. D.; Repetto, M.; *Ecotoxicol. Environ. Restoration* **2000**, *31*, 47.
79. Rahman, M. F.; Mahboob, M.; Gover, P.; *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2004**, *72*, 38.
80. Walz, I.; Schwack, W.; *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 10563.
81. Henczová, M.; Deér, A. K.; Komlósi, V.; Mink, J.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *385*, 652.
82. Skladal, P.; Fiala, M.; Krejci, J.; *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **1996**, *65*, 139.
83. Mazzei, F.; Botre, F.; Botre, C.; *Anal. Chim. Acta* **1996**, *336*, 67.
84. Gill, T. S.; Tewari, H.; Pande, J.; *Comp. Biochem. Physiol. C* **1990**, *97*, 287.
85. Durrieu, C.; Tran-Minh, C.; *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2002**, *51*, 206.
86. Chouteau, C.; Dzyadevych, S.; Durrieu, C.; Chovelon, J. M.; *Biosens. Bioelect.* **2005**, *21*, 273.
87. El Demerdash, F. M.; Elagamy, E. I.; *Int. J. Environ. Health Res.* **1999**, *9*, 173.
88. Tang, J. X.; Siegfried, B. D.; Hoagland, K. D.; Tang, J. X.; *Pest. Biochem. Physiol.* **1998**, *59*, 155.
89. Zhou, X. W.; Chen, Q. X.; Chen, Z.; He, Z. Q.; Zhou, H. M.; *Biochem. (Moscow)* **2000**, *65*, 1424.
90. Youngs, H. L.; Sundaramoorthy, M.; Gold, M. H.; *Eur. J. Biochem.* **2000**, *27*, 1761.
91. Bennun, A.; Blum, J. J.; *Biochim. Biophys. Acta* **1966**, *128*, 106.
92. Giannaccini, G.; Betti, L.; Palego, L.; Chelli, B.; Gallo, A.; Pirone, A.; Fabiani, O.; Bertellotti, S.; Lucacchini, A.; *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **2004**, *137*, 197.
93. Al Ghais, S. M.; Ahmad, S.; Ali, B.; *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2000**, *46*, 258.
94. Silva Filho, M. V.; Oliveira, M. M.; Salles, J. B.; Bastos, V. L.; Cassano, V. P.; Bastos, J. C.; *Toxicol. Lett.* **2004**, *153*, 247.
95. Salles, J. B.; Cunha Bastos, V. L.; Silva Filho, M. V.; Machado, O. L.; Salles, C. M.; Giovanni de Simone, S.; Cunha Bastos, J.; *Biochimie* **2006**, *88*, 59.
96. Guner, S.; Colak, A.; *J. Biochem. Toxicol.* **1996**, *11*, 257.
97. Gonzalez, O.; Fernandez, J.; Martin, M.; *Comp. Biochem. Physiol. C* **1987**, *86*, 163.
98. Maycock, D. S.; Prenner, M. M.; Kheir, R.; Morris, S.; Callaghan, A.; Whitehouse, P.; Morritt, D.; Crane, M.; *Water Res.* **2003**, *37*, 4180.
99. Balint, T.; Ferenczy, J.; Katai, F.; Kiss, I.; Kraczer, L.; Kufesak, O.; Lang, G.; Polyhos, C.; Szabo, I.; Szegletes, T.; Nemcsok, J.; *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **1997**, *37*, 17.
100. Vlahogianni, T.; Dassenakis, M.; Scoullou, M. J.; Valavanidis, A.; *Mar. Pollut. Bull.* **2007**, *54*, 1361.
101. Adham, K. J.; Hassan, I. F.; Taha, N.; Amin, T. H.; *Environ. Monit. Assess.* **1999**, *54*, 107.
102. Collen, J.; Pinto, E.; Pedersen, M.; Colepiccolo, P.; *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2003**, *45*, 337.
103. Kong, F. X.; Chen, Y.; *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1995**, *55*, 759.
104. Peterson, S. M.; Stauber, J. L.; *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1996**, *56*, 750.
105. Franklin, N. M.; Adams, M. S.; Stauber, J. L.; Lim, R. P.; *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2001**, *40*, 469.
106. Hampel, M.; Moreno-Garrido, I.; Sobrino, C.; Lubian, L. M.; Blasco, J.; *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2001**, *48*, 287.
107. Devriese, M.; Tsakaloudi, V.; Garbayo, I.; Leon, R.; Vilchez, C.; Vigara, J.; *Plant Physiol. Biochem.* **2001**, *39*, 443.
108. Shizhong, T.; Zan, L.; Jianhua, W.; Yongyuan, Z.; *Chemosphere* **1997**, *35*, 2713.
109. Kong, F. X.; Hu, W.; Liu, Y.; *Environ. Exp. Bot.* **1998**, *40*, 105.
110. Young, L. M.; Woung, S. H.; *J. Appl. Phycol.* **2003**, *15*, 13.
111. Dominguez, M. J.; Gutierrez, F.; Leon, R.; Vilchez, C.; Veja, J. M.; Vigara, J.; *Plant Physiol. Biochem.* **2003**, *41*, 828.
112. Hiraki, M.; Ohki, S.; Sato, Y.; Jablonkai, I.; Boeger, P.; Wakabayashi, K.; *Pest. Biochem. Physiol.* **2001**, *70*, 159.
113. Zbigniew, T.; Wojciech, P.; *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2006**, *65*, 323.
114. Saeed, A.; Tremori, E.; Manao, G.; Camici, G.; Cappugi, G.; Ramponi, G.; *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR* **1990**, *22*, 81.
115. Roche, M. J.; *Bull. Soc. Chem. Biol.* **1931**, *13*, 841.
116. Neuman, H.; *J. Biol. Chem.* **1968**, *243*, 4671.
117. Chaimovich, H.; Nome, F.; *Arch. Biochem. Biophys.* **1970**, *139*, 9.
118. Moore, M. N.; Viarengo, A.; Donkin, P.; Hawkins, A. J.; *Aquat. Toxicol.* **2007**, *84*, 80.
119. Broeg, K.; Westernhagen, H. V.; Zander, S.; Körting, W.; Koehler, A.; *Mar. Pollut. Bull.* **2005**, *50*, 495.
120. Sturve, J.; Berglund, A.; Balk, L.; Broeg, K.; Bohmert, B.; Massey, S.; Savva, D.; Parkkonen, E.; Stephensen, E.; Koehler, A.; Forlin, L.; *Environ. Toxicol. Chem.* **2005**, *24*, 1951.
121. Bottini, N.; Gloria-Bottini, F.; Borgiani, P.; Antonacci, E.; Lucarelli, P.; Bottini, E.; *Metab. Clin. Exp.* **2004**, *53*, 995.
122. Zhang, W.; Gruszecki, H. A.; Chevone, B. I.; Nessler, C. L.; *Pl. Physiol.* **2008**, *146*, 431.
123. El Hissy, F. T.; El Nagdy, M. A.; El Sharouny, H. M.; Abd Elaah, G. A.; *Folia Microbiol.* **1995**, *40*, 341.

124. Nicolau, A.; Mota, M.; Lima, N.; *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2004**, *57*, 129.
125. Nakazato, H.; Okamoto, T.; Ishikawa, K.; Okuyama, H.; *Plant Physiol. Biochem.* **1997**, *35*, 437.
126. Khangarot, B. S.; Rathore, R. S.; *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2003**, *70*, 112.
127. Reddy, M. S.; Rao, K. V. R.; *Biochem. Int.* **1990**, *22*, 1033.
128. Geraldine, P.; Bhavan, P. S.; Kalamurthy, J.; Zayapragassarazan, Z.; *J. Environ. Biol.* **1999**, *20*, 141.
129. Bhavan, P. S.; Geraldine, P.; *J. Environ. Biol.* **2004**, *25*, 213.
130. De And, A.; Sur, R. K.; *Environ. Ecol.* **1990**, *8*, 107.
131. Teh, S. J.; Clark, S. L.; Brown, C. L.; Luoma, S. N.; Hinton, D. E.; *Biomarkers* **1999**, *4*, 497.
132. Giamberini, L.; Pihan, J. C.; *Diseases Aquat. Organ.* **1997**, *28*, 221.
133. Jing, G.; Li, Y.; Xie, L.; Zhang, R.; *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **2006**, *144*, 184.
134. Radwan, M. A.; El Wakil, H. B.; Osman, K. A.; *J. Environ. Sci. Health B* **1992**, *27*, 759.
135. Bream, A. S.; *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* **2003**, *68*, 291.
136. Strmac, M.; Braunbeck, T.; *Toxicol. In Vitro* **2000**, *14*, 361.
137. Vijayavel, K.; Balasubramanian, M. P.; *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2007**, *66*, 154.
138. Sharma, R. M.; *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1990**, *44*, 443.
139. Das, B. K.; Mukherjee, S. C.; *Toxicol. Lett.* **2000**, *114*, 11.
140. Sheela, M.; Muniandy, S.; *Environ. Ecol.* **1992**, *10*, 220.
141. Kumar, K.; Ansari, B. A.; *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **1986**, *12*, 199.
142. Agrahar, S.; Pandey, K. C.; Gopal, K.; *Pest. Biochem. Physiol.* **2007**, *88*, 268.
143. Barse, A.; Chakrabarti, T.; Ghosh, T. K.; Pal, A. K.; Jadhao, S. B.; *Pest. Biochem. Physiol.* **2006**, *86*, 172.
144. Fahraeus, V. R. G. E.; Spurrell, D. R.; *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2000**, *46*, 289.
145. Misra, V.; Kumar, V.; Pandey, S. D.; Viswanathan, P. N.; *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **1991**, *21*, 514.
146. Mohan, D.; Verma, S. R.; *Toxicol. Lett.* **1981**, *8*, 171.
147. Versteeg, D. J.; Giesy, J. P.; *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **1986**, *11*, 31.
148. Verma, S. R.; Tonk, I. P.; Chand, R.; *Clin. Physiol. Biochem.* **1985**, *3*, 199.
149. Abd Elaa, G. A.; El Nagdy, M. A.; *African J. Mycol. Biotechnol.* **1999**, *7*, 7.
150. Cooper, A.; Bowen, I. D.; Lloyd, D.; *J. Cell. Sci.* **1974**, *15*, 605.
151. Braten, T.; *J. Cell. Sci.* **1975**, *17*, 647.
152. Domozych, D. S.; *Protoplasma* **1989**, *149*, 108.
153. Kruskopf, M. M.; Du Plessis, S.; *Hydrobiologia* **2004**, *513*, 59.
154. Tsekos, I.; Schnepf, E.; *Pl. Syst. Evol.* **1991**, *176*, 35.
155. Tornqvist, L.; *Environ. Exp. Bot.* **1989**, *29*, 457.
156. Sommer, J. R.; Blum, J. J.; *J. Cell. Biol.* **1965**, *24*, 235.
157. Vrba, J.; Komarkova, J.; Vyhnalek, V.; *Water Sci. Technol.* **1993**, *28*, 15.
158. Bachir, F.; *Plant Sci.* **1996**, *119*, 93.
159. Bachir, F.; Loppes, R.; *FEMS Microbiol. Lett.* **1997**, *149*, 195.
160. Knutsen, G.; *Biochim. Biophys. Acta* **1968**, *161*, 205.
161. Loppes, R.; Matagne, R. F.; *Genetics* **1973**, *75*, 604.
162. Matagne, R. F.; Loppes, R.; Deltour, R.; *J. Bacteriol.* **1976**, *126*, 937.
163. Patni, N. J.; Aaronson, S.; *J. Gen. Microbiol.* **1974**, *83*, 9.
164. Lien, T.; Knutsen, G.; *Physiol. Plant* **1973**, *28*, 298.
165. Nagy, A. H.; Erdos, G.; Beliaeva, N. N.; Gyurjan, I.; *Mol. Gen. Genet.* **1981**, *184*, 314.
166. Yamamoto, M.; *Phytochemistry* **1972**, *11*, 2451.
167. Schmitter, R. E.; Jurkiewicz, A. J.; *J. Cell. Sci.* **1981**, *51*, 15.
168. Lee, T. M.; Huang, Y. L.; Chen, M. H.; *Phycologia* **2005**, *44*, 620.
169. Rai, L. C.; Rai, P. K.; Mallick, N.; *Environ. Exp. Bot.* **1996**, *36*, 99.
170. Brasil, Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA; *Resolução nº 357*, de 17 de março de 2005, *Diário Oficial da União*, Brasília, 18 de março de 2005.